

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 juillet 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/058815 A3

- (51) Classification internationale des brevets⁷ :** C07K 14/435, C12N 15/12, 15/63, 5/10, C12Q 1/68, C07K 16/18, G01N 33/68, A61K 48/00, 39/395, 38/17, A61P 35/00
- (21) Numéro de la demande internationale :** PCT/FR2003/003895
- (22) Date de dépôt international :** 24 décembre 2003 (24.12.2003)
- (25) Langue de dépôt :** français
- (26) Langue de publication :** français
- (30) Données relatives à la priorité :** 02/16648 24 décembre 2002 (24.12.2002) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :** CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel-Ange, F-75794 Cedex 16 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et**
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** GIORGI, Dominique [FR/FR]; 391 rue du Mas du Juge, F-34980 Saint Gely du Fesc (FR). ROUQUIER, Sylvie [FR/FR]; 391 rue du Mas du Juge, F-34980 Saint Gely du Fesc (FR). SAFFIN, Jean-Michel [FR/FR]; 59 rue Michel Teule, Résidence Parc d'Alco, Appt 125, F-34080 Montpellier (FR).
- (74) Mandataire :** CABINET ORES; 36 rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (national) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (régional) :** brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :**
- avec rapport de recherche internationale
 - avec revendications modifiées
- (88) Date de publication du rapport de recherche internationale:** 17 mars 2005
- Date de publication des revendications modifiées:** 6 mai 2005
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

WO 2004/058815 A3

(54) Title: CENTROSOME-ASSOCIATED PROTEIN AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : PROTEINE ASSOCIEE AUX CENTROSOMES ET SES APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to a novel centrosome-associated protein, to the polynucleotide coding for the aforementioned protein and to the applications of said protein and polynucleotide. The overexpression of the inventive protein disrupts the mitotic spindle assembly and leads to aberrant and abortive mitoses.

(57) Abrégé : L'invention est relative une nouvelle protéine associée aux centrosomes, au polynucléotide codant pour ladite protéine ainsi qu'aux applications de ladite protéine et dudit polynucléotide. La surexpression de la protéine selon l'invention entraîne des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives.

REVENDICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau international le 16 February 2005 (16.02.05);
revendications originales 1-39 remplacées par les revendications modifiées 1-27 (6 pages)]

1°) Médicament, caractérisé en ce qu'il comprend un principe actif sélectionné dans le groupe constitué par :

- a) une protéine dénommée ASAP sélectionnée dans le groupe constitué par la protéine humaine de séquence SEQ ID NO : 1 et les protéines dont la séquence présente, au moins 80 % d'identité ou au moins 90 % de similarité, de préférence au moins 90 % d'identité ou au moins 95 % de similarité avec la totalité de la séquence SEQ ID NO : 1,
- b) un peptide d'au moins 10 acides aminés consécutifs de la protéine définie en a),
- c) un anticorps mono- ou polyclonal capable de reconnaître spécifiquement la protéine définie en a) ou le peptide défini en b),
- d) un polynucléotide codant pour la protéine définie en a) ou le peptide défini en b), ou bien un polynucléotide antisens du précédent,
- e) un fragment polynucléotidique d'au moins 15 nucléotides consécutifs du polynucléotide défini en d) ou un fragment anti-sens du précédent,
- f) un vecteur d'expression comprenant le polynucléotide défini en d) ou le fragment défini en e) et
- g) une cellule hôte transformée par le polynucléotide défini en d), le fragment défini en e) ou le vecteur défini en f).

2°) Médicament selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit polynucléotide ou ledit fragment sont sélectionnés dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 15 à 30 et 45, et les séquences antisens des précédentes.

25 3°) Médicament selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite protéine ou ledit peptide sont sélectionnés dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 2 à 14 et 46 à 53.

4°) Médicament selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit anticorps reconnaît spécifiquement la protéine de séquence SEQ ID NO : 1 ou 46, ou bien l'un au moins des peptides de séquence SEQ ID NO : 2 à 14 et 47 à 53.

5°) Utilisation d'un principe actif tel que défini à la revendication 1, sélectionné dans le groupe constitué par : la protéine ASAP définie en a), le peptide défini en b), le polynucléotide ou le fragment codants pour ladite protéine ou ledit peptide défini en d) ou en e), le vecteur d'expression défini en f) et la cellule hôte définie en g), pour la préparation d'un médicament anti-mitotique.

10 6°) Utilisation d'un principe actif tel que défini à la revendication 1, sélectionné dans le groupe constitué par : un polynucléotide ou un fragment antisens défini en d) ou en e), un anticorps défini en c) ou un vecteur comprenant ledit polynucléotide ou ledit fragment antisens défini en f), capables d'inhiber l'expression du polynucléotide ou de la protéine ASAP tels que définis à la revendication 1, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à une induction des mitoses aberrantes et abortives liées à la surexpression de ladite protéine ASAP.

15 7°) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment polynucléotidique tel que défini à la revendication 1, comme sonde pour le diagnostic des états pathologiques ou des maladies génétiques associées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à des anomalies de la division cellulaire.

20 8°) Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ladite sonde est sélectionnée dans le groupe constitué par : les séquences SEQ ID NO : 15, 17 à 44, les séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812, les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, 25 AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, 30 AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992,

AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank, et
5 les fragments d'au moins 15 nucléotides consécutifs des séquences précédentes.

10 9°) Utilisation d'un anticorps tel que défini à la revendication 1 ou à la revendication 4, pour la détection et/ou la sélection de cellules présentant des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou une induction des mitoses aberrantes et abortives liées à la surexpression de la protéine telle que définie à la revendication 1.

10 10°) Protéine isolée, dénommée ASAP, caractérisée en ce qu'il s'agit de la protéine humaine de séquence SEQ ID NO : 1 ou de la protéine murine de séquence SEQ ID NO : 46.

15 11°) Peptide, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un fragment de la protéine selon la revendication 10, sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 2 à SEQ ID NO : 14 et 47 à 53.

20 12°) Anticorps mono- ou polyclonal, caractérisé en ce qu'il reconnaît, parmi les protéines associées aux microtubules ou MAPs, uniquement et spécifiquement la protéine selon la revendication 10 ou bien un ou plusieurs peptides selon la revendication 11.

13°) Polynucléotide isolé, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

- l'ADNc de séquence SEQ ID NO : 15 codant pour la protéine ASAP humaine selon la revendication 10,

25 - l'ADNc de séquence SEQ ID NO : 45 codant pour la protéine ASAP murine selon la revendication 10,

- le fragment d'ADN génomique de 29800 nucléotides présentant la séquence SEQ ID NO : 16, correspondant au gène *asap* humain, et

30 - les polynucléotides complémentaires des précédents, sens ou anti-sens.

14°) Fragment du polynucléotide selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les sondes de séquence SEQ ID NO : 17 à 30.

5 15°) Amorce pour l'amplification du polynucléotide tel que défini à la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 31 à 43.

16°) Vecteur de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend un insert constitué par un polynucléotide selon la revendication 13 ou un fragment selon la revendication 14.

10 17°) Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un polynucléotide selon la revendication 13, un fragment selon la revendication 14 ou un vecteur selon la revendication 15.

15 18°) Organisme transgénique non-humain, caractérisé en ce que tout ou partie de ses cellules comprend au moins un polynucléotide selon la revendication 13, un fragment selon la revendication 14 ou un vecteur selon la revendication 16, sous une forme libre ou intégrée.

20 19°) Organisme transgénique non-humain selon la revendication 18, caractérisé en ce que lesdites cellules comprennent un polynucléotide selon la revendication 13 ou un fragment selon la revendication 14, non fonctionnel ou contenant une mutation.

25 20°) Méthode de diagnostic d'un état pathologique associé aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou aux anomalies de la division cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend la détermination d'une altération du profil de transcription du gène codant pour la protéine ASAP telle que définie à la revendication 1, selon au moins les étapes suivantes :

- une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN totaux à partir d'un échantillon biologique,

- une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde telle que définie à l'une quelconque des revendications 7, 8 ou 14 préalablement marquée dans des conditions classiques d'hybridation entre les ARN et la sonde, et

5 - une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

21°) Méthode selon la revendication 20, dans laquelle la deuxième étape est une étape de transcription inverse et/ou d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication 15 et la troisième étape est une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés.

10 22°) Méthode selon l'une quelconque des revendications 20 ou 21, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison à un témoin préalablement choisi.

15 23°) Méthode de diagnostic d'une maladie génétique associée aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou aux anomalies de la division cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en évidence d'une altération fonctionnelle du gène codant pour la protéine ASAP telle que définie à la revendication 1, selon au moins les étapes suivantes :

- une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir d'un échantillon biologique,

20 - une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde telle que définie à l'une quelconque des revendications 7, 8 ou 14, préalablement marquée, dans des conditions classiques d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

25 24°) Méthode selon la revendication 23, dans laquelle la deuxième étape est une étape d'amplification réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendications 15 et la troisième étape, une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

25°) Méthode selon l'une quelconque des revendications 22 ou 23, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

26°) Méthode d'évaluation *in vitro* de la capacité de prolifération ou
5 d'agressivité de cellules cancéreuses comprenant :

- une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,

- une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps tel que défini à l'une quelconque des revendications 1,

10 4 ou 11,

- une troisième étape de mise en évidence et de mesure par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé et

- une quatrième étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison du taux de complexes protéine ASAP-anticorps formés à celui 15 d'un échantillon biologique témoin préalablement choisi.

27°) Méthode de criblage d'une substance capable de moduler (activer ou inhiber) l'activité de la protéine telle que définie à la revendication 1, caractérisée en ce que :

- dans une première étape, on met en contact des cellules d'un échantillon biologique exprimant la protéine telle que définie à la revendication 1, avec une substance à tester,

- dans une deuxième étape, on mesure par tout moyen approprié de l'effet de ladite substance sur l'organisation du fuseau mitotique ou l'induction de mitoses aberrantes et abortives,

25 - dans une troisième étape, on sélectionne des substances capables de moduler ladite activité.